

PROCESS FOR THE PREPARATION OF OPTICALLY ACTIVE N-BENZYL-3-PYRROLIDINOLPatent Number: ☒ [EP0942068](#), [A4](#), [B1](#)

Publication date: 1999-09-15

Inventor(s): YASOHARA YOSHIHIKO (JP); HASEGAWA JUNZO (JP)

Applicant(s): KANEGAFUCHI CHEMICAL IND (JP)

Requested Patent: ☒ [JP10150997](#)

Application Number: EP19970946058 19971126

Priority Number (s): WO1997JP04299 19971126; JP19960331467 19961126

IPC Classification: C12P17/10; C12P17/10; C12R1/645; C12P17/10; C12R1/265; C12P17/10; C12R1/84; C12P17/10; C12R1/78

EC Classification: [C12P17/10](#)Equivalents: CN1082093C, CN1238808, ☒ [CZ289734](#), CZ9901861, DE69730444D, HU0000807, IL129881, KR2000057221, ☒ [US6214610](#), ☒ [WO9823768](#)

Cited Documents:

Abstract

The invention provides an efficient method of producing optically active N-benzyl-3-pyrrolidinol by an enzymatic reaction stereoselectively reducing N-benzyl-3-pyrrolidinone. The invention consists in a method of producing optically active N-benzyl-3-pyrrolidinol which comprises a step of obtaining a reaction mixture by treating N-benzyl-3-pyrrolidinone with cells or a culture of a microorganism, or a material derived therefrom, and a step of recovering optically active N-benzyl-3-pyrrolidinol from said reaction mixture, in which method said microorganism mentioned above is a microorganism belonging to the genus *Depodascus*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodosporidium*, *Trichosporon*, *Micrococcus*, *Komagataella*, *Ogataea* or *Zygosaccharomyces*.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-150997

(43) 公開日 平成10年(1998) 6月9日

(51) Int.Cl.⁹

識別記号

F I

C 1 2 P 17/10

C 1 2 P 17/10

C 0 7 D 207/12

C 0 7 D 207/12

// (C 1 2 P 17/10

C 1 2 R 1:84)

(C 1 2 P 17/10

審査請求 未請求 請求項の数1 F D (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-331467

(22) 出願日 平成 8 年(1996) 11月26日

(71) 出願人 000000941

鐘淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島 3 丁目 2 番 4 号

(72) 発明者 八十原 良彦

姫路市日出町 3-7-2-605

(72) 発明者 長谷川 淳三

明石市大久保町高丘 2 丁目13-4

(74) 代理人 弁理士 安富 康男 (外 1 名)

(54) 【発明の名称】 光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 N-ベンジル-3-ピロリジノン立体選択的に還元する酵素反応によるより効率的な光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法を提供する。

【解決手段】 N-ベンジル-3-ピロリジノンに、微生物の菌体、培養物又はそれらの処理物を作用させて反応液を得る工程、及び、上記反応液から、光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを採取する工程からなる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法であって、上記微生物が、デボダスカス (*Depodascus*) 属等に属する微生物である光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 N-ベンジル-3-ピロリジノンに、微生物の菌体、培養物又はそれらの処理物を作用させて反応液を得る工程、及び、前記反応液から、光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを採取する工程からなる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法であって、前記微生物が、デポダスカス (*Depodascus*) 属、デバリオマイセス (*Debaryomyces*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、ロードスボリディウム (*Rhodosporidium*) 属、トリコスボロン (*Trichosporon*) 属、マイクロコッカス (*Micrococcus*) 属、コマガタエラ (*Komagataella*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、又は、チゴサッカロマイセス (*Zygosaccharomyces*) 属に属する微生物であることを特徴とする光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、 β -ラクタム系抗生物質やジヒドロピリジン系化合物等の医薬品の合成中間体として有用な光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールは、医薬品の合成中間体として有用である。光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法としては、光学活性な化合物から合成する方法や、プロキラルな化合物から出発して不斉合成又は光学分割する方法等が知られている。このような方法として、特開平6-141876号公報には、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する活性を有する酵素の存在下、このN-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを製造する方法が開示されている。しかしながら、この方法は、工業的な培養やその後の操作が困難なカビを酵素源として使用しており、また、その基質仕込濃度及び基質から生成物への転換率が低く、実用に耐えるものではなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上記に鑑み、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する酵素反応によるより効率的な光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法を提供することを目的とするものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明は、N-ベンジル-3-ピロリジノンに、微生物の菌体、培養物又はそれらの処理物を作用させて反応液を得る工程、及び、上記

反応液から、光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを採取する工程からなる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法であって、上記微生物が、デポダスカス (*Depodascus*) 属、デバリオマイセス (*Debaryomyces*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、ロードスボリディウム (*Rhodosporidium*) 属、トリコスボロン (*Trichosporon*) 属、マイクロコッカス (*Micrococcus*) 属、コマガタエラ (*Komagataella*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、又は、チゴサッカロマイセス (*Zygosaccharomyces*) 属に属する微生物である光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法である。以下に本発明を詳述する。

【0005】 本発明においては、まず、基質であるN-ベンジル-3-ピロリジノンに、微生物の菌体、培養物又はそれらの処理物を作用させて反応液を得る。上記N-ベンジル-3-ピロリジノンは、特開昭54-16466号公報に開示されている方法で合成することができる。すなわち、ベンジルアミンとアクリル酸エチルとをマイケル付加させることにより得られる β -アラニン誘導体に、塩基の存在下クロロ酢酸エチルを反応させる。得られる化合物を金属ナトリウム存在下で環化させ、N-ベンジル-4-カルボエトキシ-3-ピロリドンを得る。このものを塩酸により脱炭酸してN-ベンジル-3-ピロリジノンを得ることができる。

【0006】 本発明においては、上記微生物として、デポダスカス (*Depodascus*) 属、デバリオマイセス (*Debaryomyces*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、ロードスボリディウム (*Rhodosporidium*) 属、トリコスボロン (*Trichosporon*) 属、マイクロコッカス (*Micrococcus*) 属、コマガタエラ (*Komagataella*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、又は、チゴサッカロマイセス (*Zygosaccharomyces*) 属に属する微生物を用いる。これらの微生物は、上記N-ベンジル-3-ピロリジノンの3位のカルボニル基を立体選択的に還元する。

【0007】 上記微生物の具体例としては特に限定されず、例えば、デポダスカス・テトラスペルマ (*Depodascus tetrasperma*) CBS 765, 70、デバリオマイセス・ハンセニー・バラエティ (*Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*) IFO 0728、クリプトコッカス・アルビダス・バラエティ・アルビダス (*Cryptococcus albidus* var. *albidus*) IFO 0378、ピキア・メンブランファシエンス (*Pichia membranaefac*

iens) IFO 0189、ロードスポリディウム・トルロイデス (Rhodospiridium toruloides) IFO 0413、トリコスボロン・ファーメンタンス (Trichosporon fermentans) ATCC 10675、マイクロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus) IFO 13867、コマガタエラ・パストリス (Komagataella pastoris) IFO 0948、オガタエラ・ポリモルファ (Ogataea polymorpha) IFO 1476、チゴサッカロマイセス・バイリイ (Zygosaccharomyces bailii) IFO 0519等を挙げる。これらの微生物は一般に、入手又は購入が容易な保存株から得ることができる。また、自然界から分離することもできる。なお、これらの微生物に変異を生じさせてより本反応に有利な性質を有する菌株を得ることもできる。また、これら微生物から組換えDNA、細胞融合等の遺伝子工学、生物工学的手法により誘導されるものであってもよい。

【0008】上記微生物は、栄養成分を含む培地を使用して培養することができる。上記培地としては、通常、寒天培地等の固体培地や液体培地等が用いられる。上記微生物を大量に培養する場合には、液体培地が好適に用いられる。上記培地には、グルコース、シュクロース、マルトース等の糖類、乳酸、酢酸、クエン酸等の有機酸類、エタノール、グリセリン等のアルコール類、又は、これらの混合物等の炭素源や、硫酸アンモニウム、りん酸アンモニウム、尿素、酵母エキス、肉エキス、ペプトン等の窒素源を混合することができる。更に、その他の無機塩、ビタミン類等の栄養源を適宜混合することもできる。上記微生物の培養は通常一般の条件により行うことができ、例えば、pH4.0~9.5、温度範囲20℃~45℃にて、好氣的に10~96時間培養する。

【0009】上記N-ベンジル-3-ピロリジノンに上記微生物を作用させる場合においては、通常、上記微生物の培養液をそのまま反応に使用することもできるが、上記培養液中の成分が反応に悪影響を与える場合には、上記培養液を遠心分離等により処理して得られる懸濁液を使用することが好ましい。

【0010】上記菌体の処理物としては特に限定されず、例えば、菌体の乾燥物、界面活性剤又は有機溶媒処理物、溶菌酵素処理物、固定化菌体又は菌体からの抽出酵素標品等を挙げる。上記培養物の処理物としては特に限定されず、例えば、培養物の濃縮物、乾燥物、界面活性剤又は有機溶媒処理物、溶菌酵素処理物等を挙げる。更に、培養菌体、培養物より酵素を精製し、これを使用してもよい。

【0011】上記N-ベンジル-3-ピロリジノンに上記微生物の菌体、培養物又はそれらの処理物を作用させ

て反応させる際には、上記N-ベンジル-3-ピロリジノンを反応初期に一括して添加してもよく、分割して添加してもよい。また、この場合の反応温度は、通常15~50℃、好ましくは、20~40℃であり、pHは、2.5~9.0である。

【0012】反応液中の上記菌体の量は上記菌体の反応の接触能力に応じて適宜使用すればよい。また、基質濃度は、0.01~50% (W/V) が好ましい。より好ましくは、0.1~20% (W/V) である。反応は、通常、振盪又は通気攪拌しながら行なう。反応時間は基質濃度、微生物量及びその他の反応条件によって適宜決定される。通常、2~168時間で反応が終了するように各条件を設定することが好ましい。上記反応を促進させるために、反応液にグルコース等のエネルギー源を1~5%の割合で加えると優れた結果が得られるので好ましい。

【0013】また、一般に生物学的方法による還元反応に必要なとされている還元型ニコチンアミド・アデニジヌクレオチド (NADH)、還元型ニコチンアミド・アデニジヌクレオチドリド (NADPH) 等の補酵素成分を添加することにより、反応を促進させることができる。具体的には、反応系にこれらを添加してもよく、NADH、NADPH等を生成する反応システムを反応系に添加してもよい。例えば、ギ酸脱水素酵素がギ酸から二酸化炭素と水とを生成する際にNADからNADHを生成する反応や、グルコース脱水素酵素がグルコースからグルコノラクトンを生成する際にNADからNADH又はNADPからNADPHを生成する反応を利用することができる。また、トリトン (半井化学社製)、スパン (関東化学社製)、ツイーン (半井化学社製) 等の界面活性剤を添加してもよい。

【0014】本発明においては、次に、反応液から、生成物である光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを採取する。上記N-ベンジル-3-ピロリジノールを反応液から採取する方法としては特に限定されず、一般的な単離法等を採用することができる。例えば、反応液に酢酸エチル等の有機溶媒を加えて抽出し、得られる抽出液を無水硫酸ナトリウム等で脱水後、減圧下で有機溶媒を除去することにより、光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの粗精製物を得ることができる。この場合においては、抽出効率を高めるために、炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム等の塩類を加えてもよい。また、必要に応じて、この粗精製物を、蒸留、シリカゲルカラムクロマトグラフィー等により更に純粋な光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールとすることもできる。

【0015】

【実施例】以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

10

20

30

40

50

【0016】実施例1

下記の組成からなる液体培地を調製し、大型試験管に5 mlずつ分注して、120℃で20分間蒸気殺菌を行った。

【0017】培地組成：

グルコース	4	%
酵母エキス	0.3	%
KH ₂ PO ₄	0.1	%
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.65	%
NaCl	0.1	%
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.8	%
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.06	%

* FeSO₄・7H₂O 0.09 %CuSO₄・5H₂O 0.005 %MnSO₄・4~6H₂O 0.01 %

水道水

pH 7.0

【0018】これらの液体培地に表2に示す微生物を1

白金耳接種して、30℃で24~72時間振盪培養し

た。次に、各培養液を遠心分離にかけて菌体を集め、水

洗後、各菌体を100 mMリン酸緩衝液 (pH 6.5)

10 1 mlに懸濁させて下記の反応液成分として使用した。

【0019】

反応液組成：

(1) 上記菌体懸濁液	1 ml
(2) グルコース	20 mg
(3) N-ベンジル-3-ピロリジノン	10 mg

【0020】上記の(1)~(3)を試験管に分注して混合し、振盪しながら30℃で20時間反応させた。反応後、各反応液に3.5 mlの酢酸エチルを加えてよく混合した。この有機層の一部をガスクロマトグラフィー

20 に供し、N-ベンジル-3-ピロリジノール量を分析した。また、その光学純度をHPLCにより測定した。
【0021】ガスクロマトグラフィー測定条件：カラム；Unipore B、10%PEG-20M、4.0 mm ID×1.0m、カラム温度；200℃、キャリアーガス；窒素、検出；FID ※

※【0022】HPLC分析条件：カラム；Chiral cel OB (ダイセル化学工業社製)、溶離液；n-ヘキサン/イソプロパノール/ジエチルアミン=99/1/0.1、検出；254 nm、流速；1 ml/分、溶出時間；(R)体6.1分、(S)体7.9分

表1に生成物への変換率と生成物の光学純度をまとめた。

【0023】

【表1】

菌株名	変換率 (%)	光学純度 (%ee)
デボダスカ・テトラスペルマ (<i>Depodascus tetrasperma</i>) CBS 765.70	10	(S) 97
デバリオマイセス・ハンセニー IFO 0728 (<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>)	7	(S) 84
クリプトコッカス・アルビダス IFO 0378 (<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>)	34	(S) 100
ピキア・メンブランファシエンシス (<i>Pichia membranifaciens</i>) IFO 0189	12	(S) 84
ロードスポリディウム・トルロイデス (<i>Rhodsporidium toruloides</i>) IFO 0413	33	(S) 74
トリコスポロン・ファーマンタンス (<i>Trichosporon fermentans</i>) ATCC 10675	75	(S) 96
コマガタエラ・パストリス (<i>Komagataella pastoris</i>) IFO 0948	14	(S) 61
オガタエラ・ポリモルファ (<i>Ogataea polymorpha</i>) IFO 1476	17	(S) 89
チゴサッカロマイセス・バイリイ (<i>Zygosaccharomyces bailii</i>) IFO 0519	12	(S) 62

【0024】実施例2

下記の組成からなる液体培地を調製し、大型試験管に10 ml分注して、120℃で20分間蒸気殺菌を行った。

【0025】培地組成：

肉エキス	1.0 %
ペプトン	1.0 %

酵母エキス 0.5 %

NaCl 0.3 %

水道水

pH 7.0

【0026】この液体培地に、マイクロコッカス・ルテウ

ス (*Micrococcus luteus*) IFO

50 13867を1白金耳接種して、30℃で24時間振盪

培養した。次に、この培養液を遠心分離にかけて菌体を集め、水洗後、菌体を100mMリン酸緩衝液(pH 6.5) 2mlに懸濁させて実施例1に示した反応液成分として使用した。20時間反応後、実施例1と同様に生成物への変換率と生成物の光学純度を測定したところ、変換率は81%、光学純度は(S)100%eeであった。

*

反応液組成:

(1) 上記菌体懸濁液	0.5ml
(2) グルコース	5.4mg
(3) ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド	0.275mg
(4) グルコース脱水素酵素(天野製薬社製)	2.84units
(5) N-ベンジル-3-ピロリジノン	1mg

【0029】上記の(1)~(5)を試験管に分注して混合し、振盪しながら30℃で20時間反応させた。反応後、実施例1と同様に生成物への変換率と生成物の光

*【0027】実施例3

表3に示した微生物を実施例1と同様に培養した。次に、各培養液を遠心分離にかけて菌体を集め、水洗後、各菌体を100mMリン酸緩衝液(pH 6.5) 1mlに懸濁させて下記の反応液成分として使用した。

【0028】

※学純度を測定しその結果を表2にまとめた。

【0030】

【表2】

菌株名	変換率(%)	光学純度(%ee)
デボダスカス・テトラスペルマ (<i>Depodascus tetrasperma</i>) CBS 765.70	15	(S) 96
デバリオマイセス・ハンセニー IPO 0728 (<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>)	9	(S) 84
クリプトコッカス・アルビダス IPO 0378 (<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>)	47	(S) 91
ピキア・メンブランファシエンシス (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IPO 0189	61	(S) 83
ロードスポリディウム・トルロイデス (<i>Rhodsporidium toruloides</i>) IPO 0413	74	(S) 76
トリコスポロン・ファーメンタンス (<i>Trichosporon fermentans</i>) ATCC 10675	74	(S) 96
コマガタエラ・パストリス (<i>Komagataella pastoris</i>) IPO 0948	18	(S) 58
オガタエラ・ポリモルファ (<i>Ogataea polymorpha</i>) IPO 1476	13	(S) 89
チゴサッカロマイセス・バイリイ (<i>Zygosaccharomyces bailii</i>) IPO 0519	15	(S) 58

【0031】実施例4

表3に示した微生物を実施例1と同様に培養した。次に、各培養液を遠心分離にかけて菌体を集め、水洗後、★

★各菌体を100mMリン酸緩衝液(pH 6.5) 1mlに懸濁させて下記の反応液成分として使用した。

【0032】

反応液組成:

(1) 上記菌体懸濁液	0.5ml
(2) グルコース	5.4mg
(3) ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド	0.26mg
(4) グルコース脱水素酵素(天野製薬社製)	2.84units
(5) N-ベンジル-3-ピロリジノン	1mg

【0033】上記の(1)~(5)を試験管に分注して混合し、振盪しながら30℃で20時間反応させた。反応後、実施例1と同様に生成物への変換率と生成物の光

学純度を測定しその結果を表3にまとめた。

【0034】

【表3】

菌株名	変換率 (%)	光学純度 (%ee)
デボダスカ・テトラスペルマ (<i>Depodascus tetrasperma</i>) CBS 765.70	33	(S) 99
デバリオマイセス・ハンセニー IFO 0728 (<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>)	6	(S) 83
ピキア・メンブランファシエンス (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0189	24	(S) 80
ロードスポリディウム・トルロイデス (<i>Rhodsporidium toruloides</i>) IFO 0413	72	(S) 76
トリコスポロン・ファーマンタンス (<i>Trichosporon fermentans</i>) ATCC 10675	74	(S) 96
コマガタエラ・パストリス (<i>Komagataella pastoris</i>) IFO 0948	19	(S) 59
オガタエラ・ポリモルファ (<i>Ogataea polymorpha</i>) IFO 1476	11	(S) 87
チゴサッカロマイセス・バイリイ (<i>Zygosaccharomyces bailii</i>) IFO 0519	13	(S) 63

【0035】実施例5

実施例2と同様に、マイクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) IFO 13867 を培養した。得られた菌体を100mMリン酸緩衝液 (pH6.5) 2mlに懸濁させて実施例3に示した反応液成分として使用した。20時間反応後、実施例1と同様に生成物への変換率と生成物の光学純度を測定したところ、変換率は78%、光学純度は(S)100%eeであった。

【0036】実施例6

実施例2と同様に、マイクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) IFO 13867 を培養した。得られた菌体を100mMリン酸緩衝液 (pH6.5) 2mlに懸濁させて実施例4に示した反応液成分として使用した。20時間反応後、実施例1と同様に生成物への変換率と生成物の光学純度を測定したところ、変換率は78%、光学純度は(S)100%eeであった。

【0037】実施例7

実施例2に示した組成からなる液体培地を調製し、500ml容坂口フラスコに100ml分注したものを25本用意し、120℃で20分間蒸気殺菌を行った。この各々に、実施例2と同様にして培養したマイクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) IFO 13867の培養液2mlを無菌的に接種して、30℃で24時間振盪培養した。得られた培養液より遠心分離により菌体を集菌し100mMリン酸緩衝液 (pH6.5) 500mlに懸濁した。これにN-ベンジル-3-ピロリジノン5gとグルコース10gを加えて30℃で24時間攪拌して反応させた。反応液のpHは6N苛性ソーダ水溶液で6.5に保った。反応後、反応液を酢酸エチル2.5Lで抽出し、水層をさらに酢酸エチル1Lで抽出した。有機層をあわせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下溶媒を留去した。残渣を蒸留し

て(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノール3gを得た。収率60%、光学純度99.8%ee、沸点132-137℃/3mmHg、旋光度 $[\alpha]_D^{20} -3.77^\circ$ (CH₃OH, C=5)。¹H-NMR δ (CDC1₃): 1.63-1.76 (1H, m)、2.09-2.21 (1H, m)、2.26-2.37 (1H, m)、2.51-2.64 (2H, m)、2.75-2.85 (1H, m)、3.38 (1H, brs)、3.61 (2H, s)、4.24-4.33 (1H, m)、7.19-7.37 (5H, m)。

【0038】実施例8

実施例1に示した組成からなる液体培地を調製し、500ml容坂口フラスコに50ml分注したものを50本用意し、120℃で20分間蒸気殺菌を行った。この各々に、実施例1と同様にして培養したトリコスポロン・ファーマンタンス (*Trichosporon fermentans*) ATCC 10675の培養液1mlを無菌的に接種して、30℃で24時間振盪培養した。得られた培養液より遠心分離により菌体を集菌し100mMリン酸緩衝液 (pH6.5) 500mlに懸濁した。これにN-ベンジル-3-ピロリジノン5gとグルコース10g、還元型ニコチンアミドアデニン・ジヌクレオチドリ酸 (興人社製) 275mg、グルコース脱水素酵素 (天野製薬社製) 1420unitsを加えて30℃で48時間攪拌して反応させた。反応液のpHは6N苛性ソーダ水溶液で6.5に保った。反応後、反応液を酢酸エチル2.5Lで抽出し、水層をさらに酢酸エチル1Lで抽出した。有機層をあわせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: 酢酸エチル/メタノール=2/1) に供して精製し(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノール2.5gを得た。収率49%、光学純度96%ee、沸点132-137℃/3mmHg、旋光度 $[\alpha]_D^{20} -3.73^\circ$ (CH₃OH, C=

5)。¹H-NMR δ (CDC1₃) : 1.63-1.76 (1H, m)、2.09-2.21 (1H, m)、2.26-2.37 (1H, m)、2.51-2.64 (2H, m)、2.75-2.85 (1H, m)、3.38 (1H, brs)、3.61 (2H, s)、4.24-4.33 (1H, m)、7.19-7.37 (5H, m)。

【0039】実施例9

実施例1に示した組成からなる液体培地を調製し、500ml容坂口フラスコに50ml分注したものを50本用意し、120℃で20分間蒸気殺菌を行った。この各*

反応液組成：

(1) 上記無細胞抽出液	0.5ml
(2) グルコース	5.4mg
(3) ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド	0.26mg
(4) グルコース脱水素酵素 (天野製薬社製)	2.84units
(5) N-ベンジル-3-ピロリジノン	1mg

【0041】上記の(1)～(5)を試験管に分注して混合し、振盪しながら30℃で20時間反応させた。反応後、実施例1と同様に生成物への変換率と生成物の光学純度を測定したところ、変換率は19%、光学純度は(S)96%eeであった。

【0042】

【発明の効果】本発明の光学活性N-ベンジル-3-ピ*

々に、実施例1と同様にして培養したトリコスポロン・ファーマンタンス (*Trichosporon fermentans*) ATCC 10675の培養液1mlを無菌的に接種して、30℃で24時間振盪培養した。得られた培養液より遠心分離により菌体を集菌し100mMりん酸緩衝液 (pH6.5) 500mlに懸濁した。これを氷冷下ブラウンの細胞破砕器により菌体を破砕後、遠心分離により得られた上清を無細胞抽出液とし、下記の反応液成分として使用した。

【0040】

※ロリジノールの製造方法は、上述の構成からなるので、光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを効率的に、かつ、工業的規模で生産することが可能である。また、本発明により得られる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールは、光学純度が高いものであり、β-ラクタム系抗生物質やジヒドロピリジン系化合物等の医薬品として有用な化合物の重要中間体である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 R 1:265)

(C 1 2 P 17/10

C 1 2 R 1:645)

C 0 7 M 7:00